13 (2) 87-94, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Antioxidant effect of Artemisia (*Artemisia incana*) extract on the quality of frozen-thawed semen of Moghani ram

Habib Ahadi [1], Amir Karimi [1*], Maghsoud Besharati [1], Vahid Vahedi [2], Namdar Kamrani [1]

[1] Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Ahar, Iran
2 Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Moghan, Iran

Key Words

Artemisia extract
Oxidative stress
Semen Cryopreservation
Moghani Ram

Abstract

Introduction: Maintaining fertility in frozen sperm is very important.
Materials & Methods: To investigate the effect of Artemisia (Artemisia incana) extract on sperm cryopservability of Moghani ram spermatozoa, different levels of the plant extract (0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 ml per deciliter) were added after extraction to diluted semen with an extender containing citrate buffer. After chilling, the semen was packaged in 0.5 ml straws and stored inside the liquid nitrogen until the evaluation of qualitative properties. This experiment was designed with 4 replications (with 10 straws in each replicate) per experimental group.
Result: Evaluation of sperm viability using eosin-nigrosine staining showed that adding 4 ml of Artemisia extract per deciliter to sheep sperm diluent had a positive effect on sperm viability. Similarly, the HOST test (hypoosmotic swelling test) to examine the integrity of the plasma membrane showed that the treatment had the highest membrane integrity ($P<0.05$). The highest and lowest Total Motility (TM) was observed in experimental groups 4 and 10 ml of extract in diluted semen, respectively ($P<0.05$). Examination of peroxidative damage by measuring malondialdehyde showed the lowest amount of malondialdehyde production was seen in the treatment with 12 mg of extract per deciliter diluent that was significantly different from other experimental groups ($P<0.05$).
Conclusion: According to the results of the present experiment, it seems that the use of 4 ml Artemisia extract per deciliter of the diluent has positive effects on the quality of sperm after freezing.

* Corresponding Author's email: pekarimi@tabrizu.ac.ir
Received: 17 April 2020; Reviewed: 19 June 2020; Revised: 8 July 2020; Accepted: 6 August 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.135491

مقاله پژوهشی

مطالعه تاثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدورالکلی درمنه (*Artemisia incana*) بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ گشایی شده قوچ مغانی

حبیب احدی[1]، امیر کریمی*[1]، مقصود بشارتی[1]، وحید واحدی[2]، نامدار کامرانی[1]

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تبریز، اهر، ایران

[2] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، مغان، ایران

کلمات کلیدی

انجماد اسپرم
قوچ مغانی
عصاره آبی درمنه

چکیده

مقدمه: حفظ توان باروری در اسپرم منجمد شده دارای اهمیت بسیار بالایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر عصاره درمنه (*Artemisia incana*) بر انجماد اسپرم، سطوح مختلف عصاره گیاه مذکور(۰، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰و۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) پس از استخراج به منی رقیق‌شده با محیط حاوی بافر سیترات اضافه گردید. پس از خنک‌سازی، منی در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی شده و تا زمان ارزیابی خصوصیات کیفی در داخل ازت مایع نگه‌داری شدند. در این پژوهش ٤ تکرار برای هر تیمار درنظر گرفته شد و در هر تکرار برای هر تیمار ۱۰ پایوت منجمد شد.

نتایج: ارزیابی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین–نیگروزین نشان داد افزودن عصاره درمنه در سطح ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به رقیق‌کننده اسپرم گوسفند تأثیر مثبتی در زنده‌مانی اسپرم داشت. هم‌چنین تست محیط هایپواسموتیک به‌منظور بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی نشان داد که از لحاظ درصدی تیمار ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به رقیق‌کننده دارای بالاترین یکپارچگی غشا بود. بالاترین درصد جنبایی کل مربوط به تیمار حاوی ٤ و پایین‌ترین درصد جنبایی مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌لیتر عصاره در رقیق‌کننده بود. بررسی شدت آسیب پراکسیداتیو با اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید نشان داد کم‌ترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید مربوط به تیمار دارای ۱۲ میلی‌گرم عصاره بر دسی‌لیتر رقیق‌کننده بود که به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی پایین‌تر بود.

نتیجه‌گیری و بحث: با توجه به نتایج آزمایش حاضر به‌نظر می‌رسد استفاده از عصاره آبی درمنه در سطح ٤ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده دارای اثرات مثبت بر فرآسنجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: pekarimi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۹ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۳۰ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۸ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱٦ مرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.135491

مقدمه

تولیدمثل و باروری مهم‌ترین عامل در بقای گونه‌ها، پیشرفت ژنتیکی و افزایش بازده پرورش دام می‌باشد. تلاش در جهت بهبود بازده تولیدمثلی، مهم‌ترین اقدام جهت افزایش بهره‌وری گله است و انجام هرگونه پژوهش در این ارتباط از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدون شک، تکنیک تلقیح مصنوعی ابزار مؤثری در موفقیت صنعت دامپروری می‌باشد (Bailey و همکاران، ۲۰۰۰). انجماد اسپرم نقش کلیدی در تولید دام داشته و استفاده از منی منجمد در صنعت گاو شیری به‌صورت یک روش متداول درآمده است. امروزه منی بسیاری از گونه‌های حیوانی، منجمد شده و در تلقیح مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهم‌ترین مزیت فرآیند انجماد، جلوگیری از کاهش قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها در طی یک دوره زمانی بلندمدت می‌باشد. اگرچه در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (دمای نیتروژن مایع) سرعت عملکرد سلول‌های اسپرم به شکل قابل توجهی کاهش می‌یابد، ولی سلول اسپرم زنده‌مانی خود را حفظ خواهد کرد (Gliozzi و همکاران، ۲۰۰۹). با کاهش و یا توقف متابولیسم اسپرم‌ها، طول عمر باروری آن‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه می‌توان آن‌ها را برای مدت زمان طولانی‌تری نگه‌داری نمود (Salamon و Maxwell، ۲۰۰۰). اسپرم نسبت به عوامل محیطی تنش‌زا حساس می‌باشد. تحقیقات مختلف در صدد به‌حداقل‌رساندن این عوامل تنش‌زا درانجماداسپرم می‌باشند. تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی طی فرآیندهای انجماد-یخ گشایی مهم‌ترین عواملی هستند که باعث ایجاد تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی در اسپرم می‌شوندکه نتیجه آن کاهش قدرت باروری‌اسپرم‌می‌باشد(Thomson و همکاران،۲۰۰۹).امروزه‌تلاش‌های زیادی برای بهبود فناوری انجماد اسپرم در حال انجام می‌باشد. کاهش دما و فرآیند انجماد با ایجاد کریستال‌های یخ در داخل سلول می‌تواند موجب آسیب به اسپرم شود. میزان آثار سوء این فرآیند در گونه‌های مختلف متفاوت است (Pesch و Bergmann، ۲۰۰۶). ساختار غشای پلاسمایی اسپرم به‌دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، باعث‌افزایش‌حساسیت‌غشانسبت به آسیب‌های‌ناشی‌از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. هم‌چنین کاهش فسفریلاسیون پروتئین‌های آکسونم که برای جابه‌جایی اسپرم ضروری هستند موجب کاهش تحرک اسپرم در حین حفاظت انجمادی می‌شوند (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰). از اصلی‌ترین عوامل ایجاد تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو در طول فرآیند انجماد- یخ‌گشایی می‌توان به تولید رادیکال‌های آزاد در طی این فرآیند اشاره‌کرد که هنگام انجماد درسلول تولید می‌شوند. از نظر فیزیولوژیکی، وجود مقادیر اندک انواع اکسیژن فعال برای توانایی لقاح و واکنش آکروزومی و ظرفیت‌یابی اسپرم نیاز است، اما مقادیر زیاد آن موجب ایجاد آسیب در اسپرم می‌شود (Barbas و Mascarenhas، ۲۰۰۹). جهت بهبود فرآیند انجماد اسپرم و کاهش رادیکال‌های آزاد فعال و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو، محققین نسبت به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های‌سنتتیک‌درمحیط‌های انجماد اسپرم اقدام نمودند (Medeiros و همکاران، ۲۰۰۲). راهکار کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در راستای رفع صدمات وارد به سلول‌ها و به‌خصوص کاهش صدمات ناشی از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی در اسپرم کافی نبوده است، زیرا که اسپرم قادر است تنها از مقدار اندکی از آنتی‌اکسیدان‌های اضافه شده به رقیق‌کننده‌ها استفاده کندو از همه مهم‌تر این‌که آنتی‌اکسیدان‌های استفاده‌شده‌طی‌فرایندفرآوری و سردسازی‌اسپرم‌خصوصیات حفاظتی خود را از دست می‌دهند (Malo و همکاران، ۲۰۱۰). به‌دلیل مشکلات ایمنی و ترکیبات سمی موجود در برخی آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک و صرفه اقتصادی، امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه قرارگرفته است. گیاهان دارویی، منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. از مهم‌ترین این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توان به فنول‌ها اشاره کرد. ترکیبات فنولیک می‌توانند از طریق واکنش انتقال الکترون‌های منفرد، رادیکال‌های آزاد و رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل را حذف کنند (Lloyd و همکاران، ۱۹۹۹). ترکیبات فنولی، متابولیت‌های ثانویه خیلی از گیاهان، به‌ویژه گیاهان دارویی هستند.این ترکیبات، توان‌آنتی‌اکسیدانی بالایی‌دارندو ازطرق مختلف، در حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد مؤثّرند (Williams و همکاران، ۲۰۰۴؛ Wong و همکاران، ۲۰۰۶). اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات‌پلی‌فنولیک‌موجود درگیاهان‌به‌طور عمده به خاصیت الکترون دهنده بودن این ترکیبات مرتبط بوده و می‌توانند با انتقال گروه هیدروکسیل از ساختمان خود به ترکیب لیپیدها آن‌ها را از حمله رادیکال‌های آزاد و فرایند پراکسیداسیون لیپیدی حفظ کنند (Osawa و همکاران، ۱۹۹۴).گیاه‌درمنه (*Artemisia incana*) گیاهی از خانواده کاسنیان و بومی آسیا است و از این قاره به اروپا و آمریکا پراکنده شده است. این گیاه دارای شکلی بوته‌ای و اعضای چوبی و ساقه‌های آن‌ها سخت و چوبی در برگ‌های کوچک پوشیده از کرک‌سفید پنهان است و تا ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر رشد می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات، نشان می‌دهدکه عصاره گیاه درمنه از توان بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد برخوردار بوده و یک آنتی‌اکسیدان خوب محسوب می‌شود (احمدوند و همکاران، ۱۳۹۲). در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان فلاونویید تام عصاره متانولی در عصاره برگ گونه درمنه برابر با ۰/۱۷±۱۳/۴۵ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره می‌باشد (Mikkonen و همکاران، ۲۰۰۱). لذا این‌مطالعه با هدف بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانی گیاه درمنه بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ مغانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و تیمارهای آزمایشی: این آزمایش در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند مغانی، واقع در شهرستان جعفر آباد مغان و آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان اجرا گردید. در این آزمایش از ۴ رأس قوچ سالم، نژاد مغانی بالغ با سن ۴-۳ سال و میانگین وزنی ۳±۷۰ کیلوگرم و تغذیه شده با جیره در حد نگه‌داری (جدول۱)، که تحت شرایط نور طبیعی قرار داشتند، استفاده شد. اسپرم‌گیری از حیوانات مذکور با کمک مهبل مصنوعی انجام شد و بلافاصله پس از جمع‌آوری منی و انتقال آن به آزمایشگاه، بررسی‌های اولیه روی منی صورت گرفت. از اسپرم‌های گرفته شده جهت تهیه ۷ گروه آزمایشی شامل تیمار شاهد (کنترل) بدون عصاره درمنه و ۶ تیمار حاوی سطوح مورد آزمایش عصاره درمنه (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر رقیق کننده) و ۴ تکرار (هر تکرار دارای ۱۰ پایوت) در هر تیمار استفاده شد.

جدول۱: جیره مورد استفاده برای حیوانات آزمایشی

ماده خوراکی	مقدار
یونجه خشک (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۴۰
دانه ذرت (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۷
دانه جو (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۲/۷
کنجاله سویا (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۹/۳
سنگ آهک (گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۱
ترکیب شیمیایی جیره	
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری)	۱/۱۶
پروتئین خام (درصد)	۱۶/۲
عصاره اتری (درصد)	۳/۷۱
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	۲۷/۸۱
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)	۱۶/۵۶
کلسیم (درصد)	۰/۹۹
فسفر (درصد)	۰/۳

جمع‌آوری و ارزیابی منی: اسپرم‌گیری، پس از عادت دادن قوچ‌ها با استفاده از مهبل مصنوعی و به‌صورت دوبار در هفته به‌مدت دو هفته انجام گرفت. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرارداده شدند تا ارزیابی اولیه اسپرم، انجام شود. نمونه‌هایی که کرمی رنگ نبودند و تحرک کم‌تر از ۷۰ درصد داشتند از آزمایش حذف شده و به‌منظور حذف اثرات فردی دام، نمونه‌های منی باقی‌مانده در مقدار مساوی باهم مخلوط شدند.

تهیه گیاه درمنه و عصاره‌گیری: جهت استفاده در آزمایش، گیاه درمنه (*Artemisia incana*) از شهرستان خواجه واقع در استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شد. از روش ماسراسیون به‌منظور عصاره‌گیری استفاده شد (Handa و همکاران، ۲۰۰۸). ابتدا گیاه را خرد کرده و مقدار ۷۵ گرم از آن را در ظرف حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. عمل عصاره‌گیری به‌منظور جلوگیری اثرات منفی تابش مستقیم خورشید، در اتاقی سر بسته، انجام و با محکم کردن درب ظرف عصاره‌گیری از تبخیر حلال جلوگیری گردید. در مدت زمان ۵ روز، ظرف حاوی گیاه و حلال در حرارت اتاق تکان داده شده و بعد از این زمان که میان غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی تعادل برقرار گردید، عمل عصاره‌گیری را خاتمه داده و سپس مخلوط حاصله از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شده و عصاره صاف، تهیه گردید (Handa و همکاران، ۲۰۰۸؛ Arabshahi و همکاران، ۲۰۰۷).

تهیه رقیق کننده و منجمد کردن منی: جهت رقیق‌سازی اسپرم از رقیق‌کننده حاوی ۷۳٪ بافر سیترات، ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ و ۷٪ گلیسرول استفاده گردید. سپس سطوح مختلف عصاره درمنه (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰و۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر) به‌عنوان تیمارهای آزمایشی، به منی رقیق‌شده افزوده شد. سپس، نمونه‌ها در داخل بشر حاوی آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد به یخچال منتقل شده و به‌مدت ۲ ساعت جهت رسیدن دمای آن‌ها به ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شدند. بعد از سپری‌شدن ۲ ساعت و رسیدن دمای نمونه‌ها به ۵ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به‌صورت دستی در پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری پر شده و جهت جلوگیری از شوک سرمایی شدید، به‌مدت ۱۲ دقیقه در معرض بخار ازت مایع قرار داده شدند و برای نگه‌داری تا زمان ارزیابی به تانک ازت (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منتقل گردیدند (Bucak و همکاران، ۲۰۰۷).

یخ‌گشایی منی: پس از خارج‌کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، جهت یخ‌گشایی منی، پایوت‌ها به‌مدت ۲۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس نمونه اسپرم یخ‌گشایی‌شده به‌داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری تخلیه شده و برای ارزیابی‌های مختلف کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گرفتند (Mustafa و همکاران، ۲۰۰۸).

بررسی فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم: جهت بررسی فرآسنجه‌های حرکتی اسپرم از قبیل، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، سرعت در مسیر میانگین، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن حرکت اسپرم، راستی مسیر طی شده، تحرک عرضی سر اسپرم و تناوب عرضی زنش، پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی از نرم‌افزار کامپیوتری CASA استفاده شد. بدین‌منظور چهار پایوت از هر گروه تیماری (هر تکرار یک پایوت) با روشی که در بالا توضیح داده شد یخ‌گشایی شده و به‌داخل میکروتیوب انتقال داده شدند. سپس با استفاده از سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از منی را برداشته و روی لام قرار داده شد و

با یک لامل تمیز نمونه بر روی لام پخش گردید. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ فاز کنتراست منتقل شده و ویژگی‌های جنبایی اسپرم با استفاده از سیستم CASA ارزیابی شد. جهت برآورد درصد جنبایی اسپرم، سه میدان دید به‌صورت تصادفی گزینش شد و اجازه داده شد تا CASA در هر میدان دید ۵ بررسی و جمعاً ۱۵ بررسی برای هر نمونه انجام دهد (Maia و همکاران، ۲۰۰۹).

بررسی زنده‌مانی اسپرم: برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده‌شد.رنگ نیگروزین به‌عنوان رنگ پس‌زمینه و ایجاد اختلاف رنگ میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر استفاده می‌شود (Douglas و Kenneth، ۲۰۱۳). براین اساس که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند، اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ‌گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده درنظر گرفته شدند (Blom، ۱۹۵۰).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی: به‌منظور بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی از تست HOST استفاده شد. تست HOST یا تست اسپرم درمحیط با فشار اسمزی پایین، همان‌گونه که از نام آن مشخص است براساس اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. باتوجه به این‌که‌اسمولاریته محیط HOST، ۱۰۰ میلی‌اسمول است و اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم، ۳۲۰ تا ۳۷۵ میلی‌اسمول است، لذا اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته پایین به سرعت واکنش می‌دهد و انتهای دم آن‌ها گره می‌خورد. بدیهی است که تنها اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم قادر هستند به این نوع تغییر واکنش دهند و اسپرم‌های مرده که در این محیط قرار می‌گیرند هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند (Douglas و Kenneth، ۲۰۱۳).

بررسی پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم: اندازه‌گیری غلظت MDA با استفاده از تیوباربیوتوریک اسید (TBA) انجام شد. ۱ مولکول MDA با ۲ مولکول TBA واکنش می‌دهدو فرآورده‌این واکنش، مولکول صورتی رنگ است که بیش‌ترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتردارد. برای‌اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، ابتدا پایوت‌ها در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شده و بلافاصله پس از افزودن یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد، نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و به تعداد سه بار با بافر سیترات شستشو و مجدداً سانتریفیوژ گردیدند. درنهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باقی‌مانده اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. برای اندازه‌گیری غلظت MDA مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشته و با یک میلی‌لیتر محلول اسیدتری‌کلریدریک ۲۰٪ و اسید تیوباربیتوریک ۰/۵ درصد مخلوط کرده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در داخل یخ سرد شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان، عدد جذب مالون دی آلدئید محلول بالایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و غلظت مالون دی آلدئید ثبت گردید (Draper و Hadley، ۱۹۹۰؛ Pinho و همکاران، ۲۰۰۶).

آنالیز آماری: طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بوده که با ۷ تیمار و ۴ تکرار اجرا گردید. آنالیز داده‌ها توسط برنامه SAS (SAS، ۲۰۰۳) و با استفاده از رویه GLM و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، طبق مدل آماری زیر انجام گرفت.

$$X_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}$$

که در این مدل، X_{ij} = متغیر وابسته، μ = میانگین کلی، T_j = اثر تیمار jام و e_{ij} = خطای آزمایشی هستند.

نتایج

بررسی نتایج فرآسنجه‌های حرکتی و کنتیکی اسپرم در سطوح مختلف عصاره درمنه در جدول ۲، نشان داده شده است. همان‌طورکه ملاحظه‌می‌شود بالاترین درصد جنبایی کل مربوط به‌تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه و پایین‌ترین درصد جنبایی مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌لیتردر دسی‌لیترعصاره‌درمنه می‌باشد.تیمارحاوی ۴میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری در میزان جنبایی بود، هم‌چنین با تیمارهای ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه، نیز تفاوت معنی‌داری داشت. با وجود این‌که میزان جنبایی از نظر عددی بین تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه و تیمارهای ۲ و ۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه اختلاف دارد ولی از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اگرچه تیمارهای ۲ و ۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه در مقایسه با تیمار شاهد دارای میزان جنبایی بالایی بودند، با این وجود تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. از نظر آماری، بین تیمارهای ۸ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه نیز اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد وجود نداشت اگرچه از نظر عددی در مقایسه با تیمار شاهد میزان جنبایی کم‌تری داشتند. درصد جنبایی پیش‌رونده نیز دارای روند مشابهی بود. بالاترین درصد جنبایی پیش‌رونده مربوط به تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه و پایین‌ترین مربوط به تیمار ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بود. میزان جنبایی پیش‌رونده در تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه، نسبت به تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بود. هم‌چنین این تفاوت معنی‌دار میان تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با تیمارهای ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه نیز مشاهده شد. تیمارهای۲

و ۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با وجود پایین بودن میزان جنبایی پیش رونده در این تیمارها در مقایسه با تیمار۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه، اختلاف معنی‌داری با این تیمار نداشتند. بین تیمارهای ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه، از نظر جنبایی پیش‌رونده اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

با توجه به جدول ۲ و بررسی ویژگی‌های بررسی شاخص سرعت در مسیر میانگین، نشان می‌دهدکه تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بالاترین میانگین شتاب جنبایی را داشته و با تیمار شاهد و تیمارهای ۸، ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه، تفاوت معنی‌داری دارد. میان تیمار حاوی ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با تیمارهای ۲ و ۶ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مورد شاخص سرعت در مسیر مستقیم، مشاهده می‌شود تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با تمام تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد و بالاترین میزان شتاب خطی پیش‌رونده متعلق به این تیمار می‌باشد. هم‌چنین مشاهده شد که تمام تیمارها در شاخص سرعت در مسیر مستقیم با یکدیگر اختلافات معنی‌داری‌داشتند.مشاهدات‌در مورد فرآسنجه‌سرعت‌درمسیر منحنی شبیه به فراسنجه سرعت در مسیر مستقیم بوده و تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بیش‌ترین مقدار شتاب منحنی خطی را به خود اختصاص داده و با سایر تیمارها دارای اختلافات معنی‌داری دارد. در شاخص راستی مسیر طی شده، بیش‌ترین میزان مربوط به تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بود. در این شاخص نیز اختلافات معنی‌دار بین تمام گروه‌های تیماری مشاهده می‌شود. در این شاخص، تیمار شاهد دارای کم‌ترین میزان در مقایسه با سایر تیمارها بود. در شاخص تناوب عرضی زنش بین تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه با شاهد و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در ارتباط با فرآسنجه تحرک عرضی سر اسپرم بالاترین میزان مربوط به تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بود و بین این تیمار با تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. هم‌چنین بین تیمارهای مختلف مقادیر مشاهده شده برای تحرک عرضی سر اسپرم تفاوت معنی‌داری داشت.

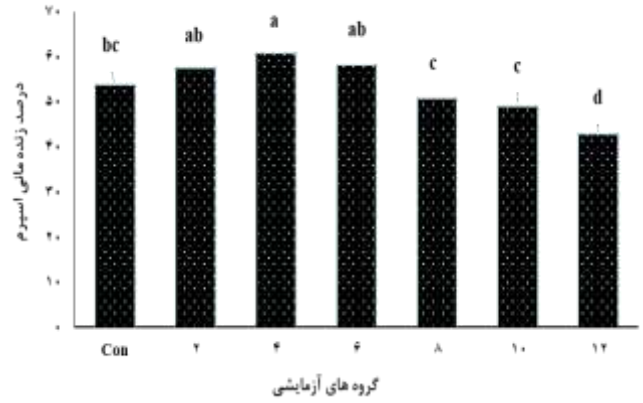
در بررسی شاخص درصد خطی بودن حرکت اسپرم، بیش‌ترین میزان مشاهده شده مربوط به تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر عصاره درمنه بودکه با تیمار شاهد و سایرسطوح تیماری‌اختلافات معنی‌داری نشان داد. در این شاخص سطوح مختلف تیماری دارای اختلافات معنی‌داری با یکدیگر بودند.

جدول۲: مقایسه فرآسنجه‌های تحرکی و کنتیکی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده قوچ مغانی توسط توسط رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف عصاره درمنه (میلی‌لیتر در دسی‌لیتر رقیق‌کننده)

فرآسنجه	گروه آزمایشی							SEM	P-Value
	شاهد	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲		
جنبایی کل (درصد)	۴۹^{bc}	$۵۲/۲۵^{ab}$	$۵۵/۲۵^{a}$	۵۳^{ab}	$۴۴/۵۰^{cd}$	$۴۳/۲۵^{d}$	$۴۶/۲۵^{cd}$	۰/۸۸	<۰/۰۰۰۱
جنبایی پیش رونده (درصد)	$۳۴/۷۵^{bc}$	۳۶^{ab}	۴۰^{a}	$۳۷/۲۵^{ab}$	$۳۱/۲۵^{cd}$	$۳۰/۲۵^{d}$	$۳۰/۲۵^{d}$	۰/۷۴	<۰/۰۰۰۱
سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر در ثانیه)	$۸۵/۴۲^{b}$	$۹۱/۲۷^{ab}$	$۹۳/۹۷^{a}$	$۹۰/۹۷^{ab}$	$۷۱/۷^{c}$	$۶۲/۹۷^{d}$	$۶۲/۷۷^{d}$	۲/۴۸	<۰/۰۰۰۱
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر در ثانیه)	$۵۲/۲^{c}$	$۵۹/۱۲^{b}$	$۶۷/۴^{a}$	$۶۰/۵۰^{b}$	$۴۶/۶۵^{d}$	$۴۱/۸۰^{e}$	$۴۴/۳۵^{de}$	۱/۷۲	<۰/۰۰۰۱
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر در ثانیه)	$۱۲۱/۲۵^{c}$	$۱۳۰/۹۵^{ab}$	$۱۳۶/۸۲^{a}$	$۱۳۰/۳۲^{b}$	$۱۱۳/۷۵^{d}$	$۱۰۳/۹۲^{e}$	$۱۱۲/۵^{d}$	۲/۱۷	<۰/۰۰۰۱
تحرک عرضی سر اسپرم (میکرومتر)	$۲/۹۰^{e}$	$۳/۳۲^{c}$	$۳/۹۳^{a}$	$۳/۶۹^{b}$	$۳/۰۹^{d}$	$۲/۸۳^{e}$	$۲/۷۴^{e}$	۰/۰۸	<۰/۰۰۰۱
راستی مسیر طی شده (درصد)	$۶۱/۰۷^{d}$	$۶۴/۸۲^{dc}$	$۷۱/۷۰^{a}$	$۶۶/۴۵^{bc}$	$۶۵/۱۲^{dc}$	$۶۶/۳۷^{bc}$	$۷۰/۷۲^{ab}$	۰/۷۲	<۰/۰۰۰۱
تناوب عرضی زنش (هرتز)	$۸/۲۷^{bcd}$	$۸/۴۲^{bc}$	$۸/۸۷^{a}$	$۸/۴۷^{b}$	$۸/۱۲^{cde}$	$۷/۸۷^{e}$	$۸/۰۷^{de}$	۰/۰۶	<۰/۰۰۰۱
خطی بودن تحرک (درصد)	$۴۲/۹۲^{dc}$	$۴۵/۱۰^{bc}$	$۴۹/۲۵^{a}$	$۴۶/۴^{b}$	۴۱^{de}	$۴۰/۲۲^{e}$	$۳۹/۴۵^{e}$	۰/۶۶	<۰/۰۰۰۱

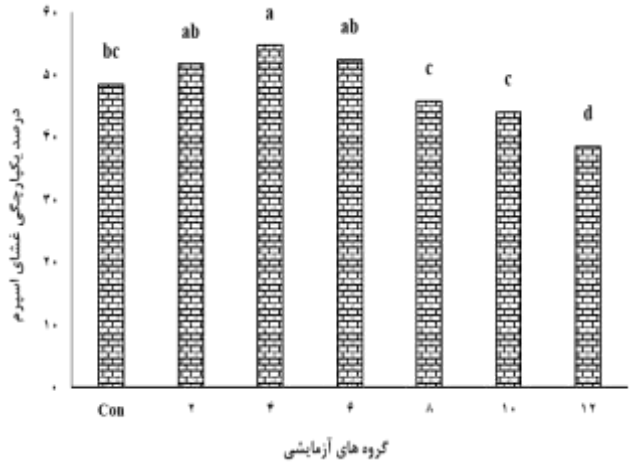
*حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

با بررسی شکل ۱، نتایج نشان می‌دهد که افزودن عصاره درمنه در سطح ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر به رقیق‌کننده اسپرم گوسفند تاثیر مثبتی در زنده‌مانی اسپرم دارد. بالاترین درصد زنده‌مانی مربوط به تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر و پایین ترین آن مربوط به تیمار ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر می‌باشد. با توجه به نتایج حاصله بین تیمار شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره تیمار اختلاف معنی‌دار وجود دارد. هم‌چنین سطوح مختلف تیماری حاوی عصاره درمنه دارای تفاوت‌های معنی‌دار با یکدیگر بودند.



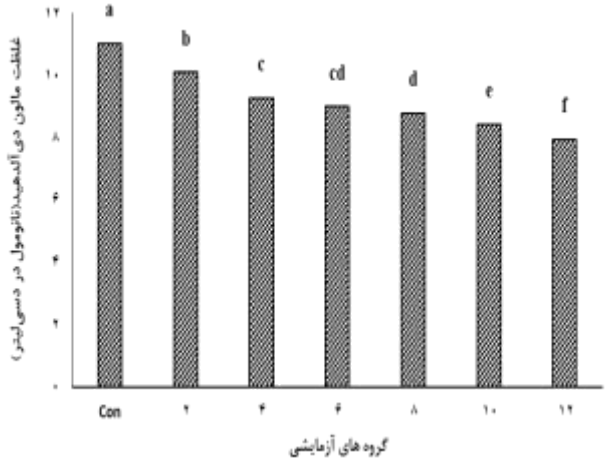
شکل ۱: نمودار تاثیر سطوح مختلف عصاره درمنه در رقیق‌کننده اسپرم بر درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ مغانی

بررسی نتایج یکپارچگی غشای پلاسمایی در شکل ۲ نشان می‌دهد که تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر دارای بالاترین یکپارچگی غشاء نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی است و کم‌ترین میزان نیز مربوط به تیمار ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر می‌باشد. در عین‌حال بین سطوح مختلف تیماری و تیمار شاهد از لحاظ یکپارچگی غشا اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود.



شکل ۲: نمودار تاثیر سطوح مختلف عصاره درمنه در رقیق‌کننده اسپرم بر درصد یکپارچگی غشای اسپرم قوچ مغانی

اندازه‌گیری میزان تغییرات مالون‌دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم در شکل ۳ آورده شده است. نتایج نشان‌دهنده آن است که کم‌ترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید مربوط به تیمار ۱۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر می‌باشد. تیمار ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر نیز در مقایسه با تیمارهای شاهدو ۲ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر، مالون‌دی‌آلدهید کم‌تری تولید کرده است. نتایج به‌دست آمده نیز نشانگر وجود تفاوت‌های معنی‌دار بین سطوح مختلف تیماری بوده است.



شکل ۳: نمودار تاثیر سطوح مختلف عصاره درمنه در رقیق کننده اسپرم بر غلظت مالون دی‌آلدهید(نانومول در دسی‌لیتر) اسپرم قوچ مغانی

بحث

مطالعه حاضر اولین بررسی در رابطه با تاثیر عصاره درمنه ایرانی بر روی پارامترهای اسپرم یخ‌گشایی شده قوچ می‌باشد. همان‌طورکه قبلاً اشاره شده است درمنه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و احتمالاً این گیاه با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو باعث افزایش کیفیت اسپرم‌ها می‌شود. نتایج بررسی نشان می‌دهدکه استفاده از عصاره‌درمنه درطی انجمادمی‌تواند به‌طور موثری اسپرم را از آسیب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده و به‌طور قابل‌توجهی تحرک‌کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا را بهبود دهد. نتایج نشان می‌دهد که منی منجمد شده‌بارقیق‌کننده‌حاوی ۴ میلی‌لیتر بردسی‌لیتر عصاره‌منجربه بالاترین سطح تحرک کل و تحرک پیش‌رونده، یکپارچگی غشا و زنده‌مانی بعد از یخ‌گشایی می‌شود. این بهبود در تحرک کل و پیش‌رونده احتمالاً با یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرماتوزوا مرتبط می‌باشد (Malo و همکاران ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱؛ Zhao و همکاران، ۲۰۰۹). استفاده از ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر تاثیر مطلوبی در خنثی کردن عوامل اکسیداسیونی و بهبود صفت تحرک پیش‌رونده داشته درحالی‌که دوزهای بالاتر تاثیر منفی داشتند. بررسی این ویژگی‌ها از این لحاظ حائز اهمیت است که بین این فرآسنجه‌ها و باروری همبستگی بالایی وجود دارد. نتایج ما در مورد پارامترهای تحرک با نتایج تحقیقات Malo و همکاران (۲۰۱۱)، Zhao و همکاران (۲۰۰۹) و Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳) و امینی‌راد و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد. هم‌چنین استفاده از ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره درمنه زنده‌مانی را به‌طور قابل‌توجهی افزایش داده و میزان اسپرم‌های مرده را در

مقایسه با سطوح دیگر تیماری کاهش داد، درحالی‌که استفاده از سطوح ۱۰ و ۱۲ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر اثر معکوسی بر اسپرم‌های زنده‌داشت‌که می‌تواند درنتیجه به‌هم‌خوردن تعادل روند اکسیداسیون و احیای سلولی باشد زیرا افزودن سطوح بالای عصاره‌ها باعث مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های مربوطه می‌گردد (Roca و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج ما در مورد پارامتر زنده‌مانی با نتایج تحقیقات Malo و همکاران(۲۰۱۱)، Zhao و همکاران(۲۰۰۹) و Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. بخشی از تاثیر مثبت رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌لیتر بر دسی‌لیتر عصاره بر تحرک کل و پیش‌رونده احتمالاً با زنده‌مانی بالاتر و کاهش اسپرم‌های مرده در این رقیق‌کننده مرتبط می‌باشد. بنابراین می‌توان استنباط کرد که عصاره درمنه در این سطح تاثیر مثبتی بر غشای اسپرم داشت. به‌عبارت دیگر نتایج تست HOST نشان داد که افزودن عصاره درمنه به رقیق‌کننده اسپرم، باعث می‌شود غشای پلاسمایی اسپرم در طی فرآیند انجماد، آسیب کم‌تری ببینند. استفاده از سایر سطوح در رقیق‌کننده، به‌ویژه دوزهای بالاتر، نه تنها اثر محافظتی برغشای اسپرم نداشته بلکه به‌دلیل به‌هم زدن فشار اسمزی بر غشای اسپرم آسیب وارد کرده است. نتایج مربوط به تست هایپواسمتیک با نتایج تحقیقات Malo و همکاران(۲۰۱۱)، Zhao و همکاران (۲۰۰۹) و Zanganeh و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. در این‌مطالعه مشاهده‌شدکه افزودن عصاره درمنه به رقیق‌کننده توانست با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم باعث کاهش سطح مالون‌دی‌آلدهید (MDA) بعد از انجماد شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با افزایش نسبت عصاره در ترکیب رقیق کننده میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید نیز کاهش یافت. دلیل این کاهش مالون‌دی‌آلدهید به خاصیت ترکیبات فنولی موجود در ترکیب عصاره می‌باشد که این ترکیبات به‌دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانع از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده و در نتیجه میزان مالون‌دی آلدهید کاهش یافته است. نتایج مربوط به غلظت مالون‌دی‌آلدهید در این مطالعه با نتایج مطالعات Malo و همکاران (۲۰۱۱)، Zhao و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. مکانیسم اصلی تاثیر درمنه در انجماد اسپرم‌هامشخص‌نیست‌ولی‌مکانیسم‌کمکی‌برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی درمنه توانایی ترکیبات فنولی و فلاونوییدهای موجود در این گیاه در پایدارسازی غشاها از طریق کاهش سیالیت غشا می‌باشد (Harborne و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین افزودن سطوح بالای عصاره درمنه با مهار بیش از حد فعالیت آنزیم‌های دخیل در اکسیداسیون و احیا و به‌هم زدن تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم‌ها باعث کاهش عملکرد اسپرم می‌شوند (Roca و همکاران، ۲۰۰۴). فلاونوئیدها می‌توانند به‌عنوان پروکسیدان عمل کنند، هرچند هر یک از آن‌ها نسبت به شرایط محیطی که در آن قرار داده می‌شوند پاسخی متفاوت از خود نشان می‌دهند. فنول‌ها در سیستم‌هایی که حاوی فلزات فعال بازدارنده هستند می‌توانند به عنوان پروکسیدان عمل کنند. وجود اکسیژن و فلزاتی مثل آهن و مس کاتدی در واکنش‌های اکسیداسیون و احیای فنول‌ها ممکن است منجر به تشکیل ROS (Reactive oxygen species) و رادیکال‌های فنوکسیل شود که به DNA، چربی‌ها و دیگر مولکول های بیولوژیکی آسیب می‌رساند (Galati و O'Brien، ۲۰۰۴). اطلاعات محدودی در مورداثرات‌آنتی‌اکسیدان‌های‌طبیعی(گیاهی)درفرآوری‌اسپرم حیوانات اهلی وجود دارد. در یک مطالعه، افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق کننده‌اسپرم‌گاوهلشتاین، موجب‌بهبودفرآسنجه‌های‌تحرک،زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شده و توانست اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کند. افزودن عصاره مرزنجوش به رقیق‌کننده، توانسته است با محافظت ساختمان غشاء اسپرم‌ها، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای‌پلاسمایی آن‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشد (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۴). دریک مطالعه دیگر اثر افزودن عصاره مرزه ماکرانتا به رقیق‌کننده منی باعث بهبود عملکرد سلول اسپرم گاو هلشتاین شامل‌تحرک،زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و حساسیت به پراکسیداسیون لیپیدگردید (دقیق‌کیا و همکاران، ۱۳۹۴).درمطالعه‌ای‌دیگرافزودن عصاره مریم‌گلی‌سهندی به رقیق‌کننده اسپرم گاو هلشتاین و اثر آن بر فرآسنجه‌های تحرک، زنده‌مانی و تست یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم مورد برررسی قرار گرفت (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه صورت گرفته بر روی تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین نشان داده شد که افزودن عصاره درمقادیر ۴ میلی‌لیتر در دسی‌لیتر با خنثی کردن عوامل اکسیداسیونی باعث بهبود صفت تحرک پیش‌رونده اسپرم شده، هم‌چنین زنده‌مانی را به‌طور قابل توجهی افزایش داده و میزان اسپرم‌های مرده را کاهش می‌دهد (شهباززاده و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به نتایج مطالعات مختلف این‌گونه به‌نظر می‌رسد که استفاده از عصاره‌های گیاهی در غلظت مناسب، باعث افزایش یکپارچگی غشای اسپرم و نهایتاً بقای اسپرم نسبت به گروه‌های شاهد می‌گردد و از این نظر مطالعه حاضر نیز در غلظت ۴ میلی‌لیتر عصاره درمنه در دسی‌لیتر رقیق‌کننده، بر نتایج مشابهی صحه گذاشته و با مطالعات فوق مطابقت دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش به‌نظر می‌رسد تاثیرگذارترین نسبت عصاره درمنه بر ویژگی‌های اسپرم از قبیل، جنبایی کل و پیش‌رونده و سایر پارامترهای حرکتی و هم‌چنین زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی و کاهش تولید مالون‌دی آلدهید، مقدار عصاره استفاده شده در تیمار ۴ میلی‌لیتر عصاره درمنه در دسی‌لیتر رقیق‌کننده می‌باشد.

منابع

۱. **احمدوند، ح.؛امیری، ح.؛دالوند، ح. و باقری، ش.، ۱۳۹۲.** خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی و اسانس روغنی گیاه درمنه. مجله دانشگاه علوم پزشکی بیرجند.دوره ۲۰،شماره ۴،صفحات ۴۱۶ تا ۴۲۴.

۲. **امینی‌راد، ا.؛ خلیلی، م. و سلطانی‌گردفرامرزی، ح.، ۱۳۸۸.** بررسی تأثیر مصرف آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در موش. مجله پزشکی هرمزگان. شماره ۳، صفحات ۱۸۲ تا ۱۸۸.

۳. **دقیق‌کیا، ح.؛ شهباززاده، ر. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره مرزه ماکرانتا بر فرآسنجه‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی. نشریه علوم دامی. دوره ۲۸، شماره ۱۰۸، صفحات ۱۰۱ تا ۱۱۲.

۴. **شهباززاده،ر.؛دقیق‌کیا،ح.؛مقدم،غ.ع.؛دهقان،غ.؛حسینخانی، ع. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی مرزه سهندی بر کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱۳ تا ۲۴.

۵. **فرهادی، ر.؛ دقیق‌کیا، ح. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** تأثیر عصاره اتانولی مریم گلی سهندی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی بر پارامترهای کیفی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های تولیدات دامی. دوره ۶، شماره ۱۲، صفحات ۷۹ تا ۸۶.

۶. **فرهادی، ر.؛ دقیق‌کیا، ح.؛ حسینخانی، ع.؛ قاسمی‌پناهی، ب.؛ دهقان، غ. و اشرفی، ا.، ۱۳۹۴.** اثرعصاره اتانولی گیاه مرزنجوش بر فراسنجه‌های کیفی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید اسپرم منجمد یخ گشایی شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. دوره ۲۵، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۱.

7. **Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007.** Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry. Vol. 102, pp: 1233-1240.
8. **Bailey, J.L.; Bilodeau, J. and Cormier, N., 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J of Andrology. Vol. 21, pp: 1-12.
9. **Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D., 2009**. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and Tissue Banking. Vol. 10, pp: 49-62.
10. **Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V. and Davies-Morel, M., 2000.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J of Andrology. Vol. 21, pp: 895-899.
11. **Blom, E., 1950.** A one minute live-dead sperm stain by means of Eosin – Nigrosin. Fertility and Sterility. Vol. 1, pp: 176-177.
12. **Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Tekin, N. and AkÁay, A.Á., 2007.** The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze thawing process. Theriogenology. Vol. 67, pp: 1060-1067.
13. **Douglas, T.C. and Kenneth, I.A., 2013.** Spermatogenesis, Methods and Protocols. Springer Science. pp: 14-15.
14. **Draper, H.H. and Hadley, M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. Vol. 186, pp: 421-431.
15. **Gliozzi, T.M.; Zaniboni, L.; Maldjian, A.; Luzi, F.; Maertens, L. and Cerolini, S., 2009.** Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. Theriogenology. Vol. 71, pp: 910-919.
16. **Handa, S.S.; Khanuja, S.P.S.; Longo, G. and Rakesh, D.D., 2008.** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Vol. 1, pp: 22.
17. **Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2000.** Advances in Flavonoid research since 1992. Phytochemistry. Vol. 55, No. 6, pp: 481-504.
18. **Galati, G. and O'Brien, P.J., 2004.** Potential Toxicity of Flavonoids and Other Dietary Phenolics: Significance for Their Chemopreventive and Anticancer Properties. Free Radical Biology & Medicine. Vol. 37, pp: 287-303.
19. **Lloyd, D.R. and Phillips, D.H., 1999.** Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxy deoxy guanosine and putative intrastrand cross-links. Mutation Research. Vol. 424, pp: 23-36.
20. **Maia, M.S.; Bicudo, S.D.; Azevedo, H.C.; Sicherle, C.C.; Sousa, D.B. and Rodello, L., 2009.** Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. Small Ruminant Research. Vol. 85, pp: 85-90.
21. **Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Martinez, F. and Gale, I., 2011.** Antioxidant effect of rosemary(*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology. Vol. 75, No. 9, pp: 1735-1741.
22. **Malo, C.; Gil, L.; Gonzalez, N.; Martínez, F.; Cano, R.; De Blas, I. and Espinosa, E., 2010.** Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology. Vol. 61, No. 1, pp: 142-147.
23. **Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T. and Rodrigues, J.L., 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. Vol. 57, pp: 327-44.
24. **Mustafa, N.B.; Ahmet, A. and Abdurrauf, Y., 2008.** Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze- thawing process, Small Ruminant Research. Vol. 75, pp: 128-134.
25. **Osawa, T.; Uritani, I.; Garcia, V. and Mendoza, V., 1994.** Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics. Japan Scientific Societies Press: Tokyo, Japan. pp: 241-251.
26. **Pesch, S. and Bergmann, M., 2006.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. Micron. Vol. 37, pp: 597-612.
27. **Pinho, R.A.; Andrades, M.E.; Oliveira, M.R.; Pirolo, A.C.; Zago, M.S.; Silveira, P.C.L.; Dal-Pizzol, F. and Moreira, J.C.F., 2006.** Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. Cell Biology International. Vol. 30, pp: 848-853.
28. **Roca, J.; Gil, M.A.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M. and Martinez, E.A., 2004.** Survival and Fertility of Boar Spermatozoa After Freeze-Thawing in Extender Supplemented with Butylated Hydroxytoluene. Andrology. Vol. 25, No. 3, pp: 397-405.
29. **Salamon, S. and Maxwell, W.M., 2000.** Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. Vol. 62, pp: 77-111.
30. **Thomson, L.K.; Fleming, S.D.; Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Zieschang, J.A. and Clark, A.M., 2009.** Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Human Reproduction. Vol. 24, pp: 2061-2070.
31. **Williams, R.J.; Spencer, J.P. and Rice-Evans C., 2004.** Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Biology & Medicine. Vol. 36, No. 7, pp: 838-849.
32. **Wong, C.C.; Li, H.B.; Cheng, K.W. and Chen, F., 2006.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chemistry. Vol. 97, No. 4, pp: 705-711.
33. **Zanganeh, Z.; Zhandi, M.; Zare Shahneh, A.; Najafi, A.; Mahdi Nabi, M. and Mohammadi Sangcheshmeh, A., 2013.** Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. Vol. 114, No. 1, pp: 120-125.
34. **Zhao, H.w.; Li, Q.w.; Ning, G.z.; Han, Z.S.; Jiang, Z.L. and Duan, Y.F., 2009.** Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. Theriogenology. Vol. 71, No. 5, pp: 849-857.